

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Viktorija Cigler

USPOREDBA

SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

S METODOM INDUKTIVNO

SPREGNUTE PLAZME S MASENOM

SPEKTROMETRIJOM (ICP-MS) ZA

ODREĐIVANJE CINKA U SJEMENOJ

PLAZMI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Viktorija Cigler

USPOREDBA

SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

S METODOM INDUKTIVNO

SPREGNUTE PLAZME S MASENOM

SPEKTROMETRIJOM (ICP-MS) ZA

ODREĐIVANJE CINKA U SJEMENOJ

PLAZMI

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Osijek

Mentor: doc. dr. sc. Sanja Mandić, mag. med. biochem.

Neposredni voditelj: dr. sc. Dario Mandić

Rad ima 37 listova, 1 tablicu i 14 slika.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Sanji Mandić na neizmjernom trudu, pomoći u svakom trenutku, razumijevanju te uloženom vremenu. Također hvala dr. sc. Dariju Mandiću na velikoj pomoći i uloženom trudu kada god je to bilo potrebno.

Zahvaljujem dr. sc. Jasni Jurasović s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu i doc. dr. sc. Suzani Ćavar iz Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije na pomoći u određivanju koncentracije cinka u sjemennoj plazmi.

Također hvala svim djelatnicima Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek na pomoći u izradi diplomskog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek bili uz mene i bili mi najveća podrška.

1. UVOD.....	1
1.1. Evaluacija	1
1.1.1. Validacija i verifikacija.....	1
1.2. Spektrofotometrijske metode.....	2
1.3. Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom	3
1.3.1. Princip rada	3
1.4. Uloga cinka u ljudskom organizmu	4
1.4.1. Utjecaj cinka na reproduktivni sustav.....	5
1.4.2. Antioksidativna svojstva cinka.....	5
1.5. Neplodnost.....	6
1.5.1. Muška neplodnost.....	6
2. HIPOTEZA	8
3. CILJ	9
4. ISPITANICI I METODE.....	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Ispitanici	10
4.3. Metode.....	10
4.3.1. Sakupljanje uzoraka	10
4.3.2. Određivanje Zn spektrofotometrijskom metodom	11
4.3.3. Određivanje Zn metodom ICP-MS.....	11
4.4. Statističke metode	13
5. REZULTATI.....	14
6. RASPRAVA	25
7. ZAKLJUČAK	30
8. SAŽETAK	31
9. SUMMARY	32
10. LITERATURA.....	34
11. ŽIVOTOPIS	37

POPIS KRATICA

ICP-MS (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*) – induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom

5-Br-PAPS – [(2-5-bromo-2-piridilaza)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino) fenol]

DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetraoctena kiselina

FAAS (engl. *flame atomic absorption spectroscopy*) – plamena atomska apsorpcijska spektroskopija

GFAAS (engl. *graphite furnace atomic absorption spectroscopy*) – atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom peći

LOD (engl. *limit of detection*) – granica detekcije

LOQ (engl. *limit of quantification*) – granica kvantifikacije

OAT – oligoastenoteratozoospermija

ORS (engl. *Octopole Reaction System*)

PUFA (engl. *polyunsaturated fatty acid*) – višestruko nezasićene masne kiseline

RNA (engl. *ribonucleic acid*) – ribonukleinska kiselina

ROS (engl. *reactive oxygen species*) – reaktivni kisikovi spojevi

SD – standardna devijacija

WHO (engl. *World Health Organization*) – Svjetska zdravstvena organizacija

1. UVOD

Svako uvođenje nove analitičke tehnike u medicinsko-biokemijski laboratorij zahtijeva njenu verifikaciju prije uvođenja u kliničku praksu. Povećanje broja pacijenata u zdravstvenim ustanovama stvara opterećenje medicinsko-biokemijskim laboratorijima. Iz tog razloga konstantno se proučavaju razne metode koje bi se mogle uvesti u laboratorije i koje bi osigurale brze, točne i pouzdane rezultate na temelju kojih će biti postavljena ispravna dijagnoza. Rast broja pacijenata uvjetuje otvaranje novih laboratorija, a time i uvođenje novih metoda i analitičkih sustava u laboratorijsku rutinu. Tu nastaje problem zbog primjene različitih metoda u provođenju pretraga. Prilikom uvođenja referentne metode laboratorij pokušava zadovoljiti nekoliko važnih kriterija: prihvatljiva cijena analitičkog sustava, mogućnost analize velikog broja uzoraka, brzina analize te točnost i ponovljivost rezultata. Postoje razne metode procjene usporedivosti rezultata dviju laboratorijskih analitičkih metoda koje mjere iste analite. Njihova svrha je dokumentiranje i eksperimentalno dokazivanje kako nema značajne razlike između rezultata dobivenih različitim metodama.

1.1. Evaluacija

Prije uvođenja novih analitičkih metoda u laboratorijsku rutinu potrebno je napraviti postupak evaluacije. Evaluacija je objektivna procjena ili utvrđivanje karakteristika analitičkog sustava koji uvodimo u rutinski rad. Na taj se način saznaje jesu li nove analitičke metode primjenjive za kliničku svrhu za koju su namijenjene. Rezultati dobiveni evaluacijom statistički se obrađuju te se procjenjuje pogreška metode koja se uspoređuje s određenim kriterijima prihvatljivosti. Odluka o (ne)uvođenju nove metode donosi se na temelju usporedbe pogreške metode s određenim kriterijima prihvatljivosti. U postupku evaluacije razlikujemo validaciju i verifikaciju.

1.1.1. Validacija i verifikacija

Validacija je postupak dokazivanja da analitička metoda služi svrsi kojoj je namijenjena. Za provođenje validacije potrebno je definirati svrhu metode, odrediti prikladne parametre validacije, postaviti kriterije prihvatljivosti, napraviti laboratorijske eksperimente, obraditi podatke te usporediti rezultate s postavljenim kriterijima (1). Validaciju metode analitičkih sustava uglavnom provodi proizvođač. Postupak validacije uključuje niz koraka potrebnih za njezinu provedbu:

- preciznost – predstavlja bliskost slaganja između nezavisnih rezultata mjerenja provedenih u propisanim uvjetima
- istinitost – definira se kao bliskost slaganja između srednje vrijednosti dobivene iz većeg broja ponavljanih mjerenja i prihvaćene referentne vrijednosti; mjera istinitosti je odstupanje (engl. *bias*) odnosno razlika dobivenih rezultata ispitivanom metodom i vrijednosti izmjerene usporednom metodom
- linearnost – predstavlja sposobnost metode da daje mjerljivi signal proporcionalan koncentraciji analita u uzorku
- granica detekcije (engl. *limit of detection, LOD*) – najniža vrijednost analita koja se može detektirati u uzorku
- granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification, LOQ*) – najniža vrijednost analita koja se u odgovarajućim uvjetima kvantitativno određuje s odgovarajućom preciznosti i istinitosti
- specifičnost – označava određivanje točno određenog analita
- selektivnost – označava određivanje većeg broja analita pod uvjetom da određivanje jednog ne utječe na određivanje drugog
- analitička specifičnost – sposobnost metode da mjeri željeni analit
- utjecaj matrice – predstavlja utjecaj neželjenih komponenti u uzorku na rezultat mjerenja
- interferencije – predstavljaju određene tvari koje su prisutne u uzorku, a uzrokuju odstupanje izmjerene vrijednosti u odnosu na pravu vrijednost.

Za razliku od validacije, verifikacija je postupak koji uključuje potvrđivanje općih karakteristika analitičke izvedbe metode koju je postavio proizvođač. Tijekom postupka verifikacije dovoljno je provjeriti preciznost, istinitost i linearnost metode (2). Na temelju verifikacijskih podataka donosi se odluka prihvatljivosti postupka ispitivanja za odgovarajuću namjenu.

1.2. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija je najčešće korištena tehnika analize u kliničkim laboratorijima. Spektrofotometrijski analizatori su analitički precizni te imaju veliku ponovljivost. Princip mjerenja temelji se na Lambert-Beerovom zakonu apsorpcije koji kaže kako je količina apsorbiranog svjetla u otopini proporcionalna duljini optičkog puta i množinskoj koncentraciji otopljenih tvari odnosno molekula koje apsorbiraju svjetlo.

Biokemijski analizatori spektrofotometrijskom metodom mjere analite u kombinaciji s odgovarajućim reagensima, kalibratorima i materijalima za kvalitetu kontrole. Ovom metodom može se analizirati serum, urin, puna krv te ostali tekući biološki materijali (3).

Mjerenje analita odvija se spektrofotometrom u sklopu biokemijskog analizatora koji mjeri apsorpciju analita nakon reakcije nastale u mjernoj otopini. Spektrofotometar sastoji se od izvora zračenja, monokromatora i detektora. Svjetlost iz lampe (izvor zračenja) putuje kroz monokromator i prolazi kroz mjerni uzorak. Monokromator je izveden tako da je moguće mijenjati valnu duljinu svjetla koje propušta, ovisno o metodi koju koristimo i analitu kojega želimo mjeriti. Intenzitet svjetla potom se mjeri pomoću fotodiode ili drugog svjetlosnog senzora (detektora). Mjerenjem intenziteta svjetla koje je analit u uzorku apsorbirao, usporedbom s kalibracijskim pravcem (dobivenim mjerenjem apsorpcije svjetla poznatih koncentracija analita) možemo odrediti koncentraciju analita u otopini.

1.3. Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom

Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS) predstavlja suvremenu metodu koja se koristi za mjerenje metala i metaloida u biološkim uzorcima. Kao ionizacijski izvor koristi se induktivno spregnuta plazma, a detekcija se odvija masenom spektrometrijom. ICP-MS koristi se od 1983. godine u različitim područjima znanosti za analizu elemenata u tragovima (4). Može provoditi kvalitativne, polukvantitativne i kvantitativne analize. Jedna od glavnih prednosti ove metode je multielementarna analiza, nizak limit detekcije i sposobnost mjerenja izotopa elemenata. Osim visoke cijene uređaja, veliki nedostatak ove tehnike predstavlja njezina osjetljivost na tragove nečistoća iz reagensa te prisutnost nekih iona koji mogu smetati u otkrivanju željenih elemenata.

1.3.1. Princip rada

U nebulizatoru se uneseni uzorci miješaju s plinom te stvaraju aerosol, a potom se male kapljice aerosola razdvajaju od većih kapljica pomoću komore za sprejanje te se unose u kvarcnu baklju. Prije nego uđu u maseni spektrometar, uzorci prolaze kroz baklju te kroz faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije. Molekule aerosola putuju plazmom te se formiraju pozitivno nabijeni ioni. Nastali ioni prenose se kroz dva metalna konusa u sučelje masenog spektrometra. Uloga sučelja je prijenos iona iz plazme s atmosferskim tlakom u područje nižeg tlaka (maseni spektrometar). Ioni potom dolaze do ionskih leća čija je uloga da pravilno prenesu ione i zaustave neutralne čestice i fotone. Zahvaljujući ionskim lećama,

pozitivno nabijeni ioni su odvojeni od ostalih čestica te se na temelju omjera masa/naboj razdvajaju i potom detektiraju upotrebom multiplikatora elektrona.

1.4. Uloga cinka u ljudskom organizmu

Važnost cinka ustanovljena je 1963. godine. U proteklih 50 godina opažen je golemi napredak u kliničkoj medicini vezan za metabolizam cinka u ljudskom organizmu (5). Nakon željeza, cink je u čovjeka drugi najzastupljeniji element u tragovima te je prisutan u svim ljudskim stanicama. U kostima i mišićima nalazi se oko 90 % sveukupne njegove koncentracije (6). Također ga ima u krvnim stanicama (eritrociti, leukociti), jetri, prostati, bubrezima, koži te u najvažnijem mišićnom organu – srcu. Neophodan je za rad fizioloških procesa kao što su sinteza DNA, stanična dioba, rast i reprodukcija, jačanje imunološkog sustava, zacjeljivanje rana te mnogih drugih (7). U ljudskom organizmu količina ovog minerala je relativno konstantna te se koncentracija u organizmu razlikuje ovisno o njegovoj fiziološkoj funkciji.

Na molekularnoj razini cink ima 3 glavne biološke funkcije, a to su uloga katalizatora, strukturnog i regulatornog iona. Cink kao takav potreban je za djelovanje više od 300 metaloenzima, 500 proteina regulatora gena te mu je svakako jedna od vodećih uloga omogućavanje ispravnog djelovanja različitih tkiva, organa i cijelog organskog sustava (8).

Cink sudjeluje u enzimskim reakcijama na molekularnoj razini. Djeluje na regulaciju sinteze proteina i aktivira DNA i RNA polimerazu, a nužan je i u procesu stvaranja hormona. Iznimno je važan za normalno funkcioniranje imunološkog sustava, prvenstveno preko utjecaja na aktivaciju i stvaranje T-limfocita. Istraživanja su pokazala kako cink djeluje neposredno na stvaranje kolagenog i koštanog tkiva, tako da je kod adolescenata u razdoblju rasta od velikog značaja (9).

Smanjena koncentracija cinka u pravilu je moguća zbog njegovog neadekvatnog unosa, povećanog gubitka iz tijela ili povećane potrebe za njim. Populacije koje imaju veći rizik od nedostatka cinka su osobe s bolestima gastrointestinalnog trakta, vegetarijanci, trudnice, starija dojenčad te alkoholičari. Ove grupe ljudi osobito trebaju voditi računa o unosu cinka te uključiti dobre i kvalitetne izvore cinka kroz vlastitu prehranu. Svakako najbolji izvor cinka nalazimo u mesnim proizvodima, mliječnim proizvodima, orašastim plodovima, povrću i voću (10).

1.4.1. Utjecaj cinka na reproduktivni sustav

Bertran i Vladesco su 1921. godine prvi primijetili prisutnost cinka u sjemenu. S vremenom je mnogo znanstvenika proučavalo njegovu ulogu u plodnosti muškaraca te se brojnim istraživanjima pokušavalo otkriti gdje mu je najveća koncentracija. Otkrilo se da sjemena plazma, spermatozoidi i prostata sadrže najveću količinu cinka među svim biološkim tekućinama i tkivima u čovjekovom tijelu (11). S obzirom na brojne biološke funkcije cinka, njegov deficit može utjecati na zdravstveno stanje cijelog organizma, a tu ubrajamo i poremećaje reprodukcije. WHO procjenjuje da 1/3 svjetske populacije ima nedostatak cinka (12).

Cink primarno služi kao zaštita spermatozoida (10). Uz razne enzime (kisela fosfataza, alanin aminotransferaza, alkalna fosfataza, aspartat aminotransferaza), lipide, makroelemente (natrij, kalij, kalcij, magnezij, fosfat i klorid) i mikroelemente (bakar, željezo) pruža zaštitu spermatozoidima te također utječe na kvalitetu sjemena (13). Bitan je za održavanje sluznice reproduktivnih organa te igra važnu ulogu u stabilizaciji stanične membrane i nuklearnog kromatina spermatozoida u sjemenoj plazmi (10).

1.4.2. Antioksidativna svojstva cinka

Svakodnevno se u organizmu stvaraju slobodni radikali koji pri umjerenim koncentracijama imaju dvije važne uloge u normalnom funkcioniranju ljudskog organizma. Imaju ulogu regulatornog posrednika u signalnim putevima važnim za razne stanične funkcije te imaju zaštitnu ulogu od patogena u imunološkim stanicama. No, ukoliko dođe do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, može doći do oksidativnog stresa u kojem dolazi do gubitka ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti stanice da ih ukloni. U takvom stanju prisutan je porast reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*). Visoke razine ROS-a utječu na funkciju spermija oksidacijom lipida, proteina i DNA (14). Mnoga su istraživanja pokazala da cink ima antioksidativna svojstva. Stoga manjak cinka može biti razlog nastanka oksidativnog stresa. Oksidativni stres čini 30 – 80 % uzroka muške neplodnosti (15). Male količine ROS-a ne mogu naškoditi spermijima u oplodnji, ali veće količine negativno utječu na funkciju spermija u smislu smanjenja njihove pokretljivosti. Koncentracija antioksidativnih molekula je u korelaciji s oplodnim značajkama sjemena (16). Sjemena tekućina i spermiji od enzimskih antioksidacijskih molekula sadrže superoksid-dismutazu, glutationperoksidazu, glutation-reduktazu i katalazu. Jedan od važnijih enzima u sjemenoj plazmi i spermijima je superoksid-dismutaza (SOD). Cink je bitna sastavnica ovog antioksidativnog enzima (Cu/Zn SOD) koji katalizira uklanjanje superoksidnog radikala.

Membrana spermija bogata je nezasićenim masnim kiselinama (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acid*). Visoki udio nezasićenih masnih kiselina daje potrebnu fluidnost spermijima koja omogućuje njihovo spajanje s jajnom stanicom. Ukoliko dođe do peroksidacije membranskih PUFA, membrane gube fluidnost te time i oplodnu sposobnost spermija. Osim oštećenja membrana, ROS također oštećuje DNA te može potaknuti oksidaciju sulfhidrilnih skupina u bjelancevinama i na taj način promijeniti strukturu te smanjiti pokretljivost i funkciju spermija. Lipidna peroksidacija najizraženija je u srednjem dijelu i repu spermija, a manje izražena u glavi gdje je prisutna najizraženija antioksidacijska aktivnost (17).

1.5. Neplodnost

Neplodnost je medicinski i socijalni problem koji pogađa oko 15 % parova u reproduktivnoj dobi (18). Razni su uzorci neplodnosti. Velik utjecaj imaju socijalni, ekonomski te zdravstveni čimbenici. U mnogim istraživanjima zdravstveni čimbenici opisani su kao najvažniji uzrok neplodnosti. Možemo ih podijeliti na muške koji čine 35 % (subfertilnost i infertilnost), ženske koji čine isto tako 35 % (anovulacija, oštećenje tuba, abnormalnosti maternice) i zajedničke čimbenike koji čine 30 % (nerazjašnjena neplodnost, upale reproduktivnog sustava, onkološki problemi i dr.) (19). Smanjena plodnost smatra se vrlo važnim uzrokom depopulacije i jedan je od vodećih javnozdravstvenih problema.

1.5.1. Muška neplodnost

Od svih čimbenika koji utječu na plodnost, u 35 % slučajeva uzrok je poremećena reproduktivna funkcija kod muškaraca. Najčešći poremećaji su anomalije i infekcije urogenitalnog sustava, poremećaj endokrinog i imunološkog sustava te genetske anomalije (20). Iako su medicini poznati mnogi uzroci muške neplodnosti, u 30 – 40 % slučajeva uzrok je nedefiniran. Uzroci neplodnosti kod muškaraca mogu se podijeliti u 3 skupine. To su pretestikularni (Kallmanov sindrom, višak androgena i estrogena, adenom hipofize), testikularni (nasljedne abnormalnosti, zračenja, lijekovi) i posttestikularni uzroci (ageneza sjemenih mjehurića, opstrukcija epididimisa).

Uz fizikalan pregled važno je uključiti povijest bolesti te dakako analizu sjemeni. Postoje razne abnormalnosti spermija (oligozoospermija, astenozoospermija, teratozoospermija, azoospermija). Česta pojava je oligoastenoteratozoospermija (OAT) koja uključuje smanjen broj, promjenu oblika te smanjenu pokretljivost spermija. Za normalnu funkciju spermija nužna je adekvatna razina cinka u reproduktivnim organima i brojna su

UVOD

istraživanja utvrdila jasnu povezanost koncentracije cinka u sjemenjnoj tekućini s parametrima spermioqrana i plodnošću muškaraca (10).

2. HIPOTEZA

Hipoteza ovog rada je da nema statistički značajne razlike u rezultatima mjerenja između spektrofotometrijske metode i ICP-MS metode za mjerenje koncentracije cinka u sjemenoj plazmi.

3. CILJ

Cilj ovog istraživanja je usporediti rezultate koncentracije cinka u sjemenoj tekućini dobivene metodom preporučenom od strane WHO (spektrofotometrijska metoda s 5-Br-PAPS) s rezultatima dobivenim metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS, engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*). Specifični ciljevi su:

1. odrediti koncentraciju cinka u sjemenoj plazmi spektrofotometrijskom metodom s 5-Br-PAPS
2. odrediti koncentraciju cinka u sjemenoj plazmi ICP-MS metodom
3. obradom dobivenih podataka utvrditi postoji li statistički značajna razlika u rezultatima dobivenim ovim metodama.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Provedeno istraživanje ustrojeno je kao presječna studija.

4.2. Ispitanici

U ovom istraživanju koristili su se uzorci sjemene tekućine 185 pacijenata koji su u postupku obrade zbog ispitivanja neplodnosti zaprimljeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku. Uzorci su sakupljeni u periodu od rujna 2016. do siječnja 2017. godine.

Ukoliko uzorci nisu bili adekvatni za daljnju obradu, isključili bi se iz istraživanja. Toj kategoriji pripadaju oni ispitanici koji nisu imali dovoljno sjemene tekućine za kompletnu obradu uzorka te oni kod kojih nije došlo do lize koaguluma pa nije bilo moguće napraviti biokemijsku analizu.

Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak. Odobrenje za provođenje cijelog istraživanja dobiveno je od Etičkog povjerenstva KBC-a Osijek, a istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom.

4.3. Metode

Metode koje smo koristili za određivanje cinka u uzorcima sjemene plazme su spektrofotometrijska metoda s 5-Br-PAPS i metoda induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS).

4.3.1. Sakupljanje uzoraka

Uzorak ejakulata prikupljen je masturbacijom ispitanika u prikladnu posudu nakon četiri dana apstinencije od seksualnih aktivnosti. Uzorak se u posudama koagulira te stajanjem na sobnoj temperaturi uz djelovanje enzima iz prostate prelazi u tekuće stanje odnosno dolazi do likvefakcije ejakulata. Vrijeme potrebno za dobivanje takvog uzorka je otprilike 30 minuta. Likvefakcijom ejakulata dobivena je sjemena plazma koja se potom centrifugira na 1500 xg 10 minuta. Uzorke sjemene plazme pohranili smo u prikladne posudice na -20 °C do analize. Prije same analize uzorke sjemene plazme izvadili smo iz hladnjaka i ostavili na sobnoj temperaturi te ih lagano homogenizirali neposredno prije daljnje obrade.

4.3.2. Određivanje Zn spektrofotometrijskom metodom

Prema preporukama WHO-a, mjerenje koncentracije cinka u sjemenjnoj tekućini određuje se spektrofotometrijskom metodom s 5-Br-PAPS [(2-5-bromo-2-piridilaza)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino) fenol]. Radi se o direktnoj kolorimetrijskoj metodi bez deproteinizacije. U Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku u KBC-u Osijek ova se metoda koristi za rutinska mjerenja koncentracije cinka u sjemenjnoj plazmi.

Likvefakcijom ejakulata te centrifugiranjem sjemenjnoj plazme na sobnoj temperaturi, dobili smo adekvatan uzorak za daljnju obradu. Uzorak je zatim razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1 : 21. Za određivanje koncentracije cinka korišten je komercijalni kit (Sentinel Diagnostics, Milano, Italija). Kit sadrži reagens 1 (pufer s maskirajućim agensom za bakar i željezo), reagens 2 (5-Br-PAPS) i standard cinka poznate koncentracije. Princip spektrofotometrijske metode za određivanje koncentracije cinka temelji se na reakciji 5-Br-PAPS s cinkom u uzorku, čime nastaje stabilni kompleks crvenkaste boje. Intenzitet obojenog kompleksa mjeri se na 570 nm pri pH 8,0 i temperaturi od 37 °C. Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji cinka u uzorku. 5-Br-PAPS je kolorimetrijski reagens koji se osim za određivanje cinka koristi i za mjerenje koncentracije bakra, željeza, kobalta te mnogo drugih metala. Uloga reagens 1 je, osim održavanja pH reakcijske smjese, i sprječavanje interferencije raznih drugih oligoelemenata pri određivanju cinka.

Koncentraciju cinka odredili smo na automatskom biokemijskom analizatoru Beckman-Coulter AU680 (Beckman-Coulter, Brea, SAD) u kojem uz prethodno navedene reagentse nastaje reakcija cinka i 5-Br-PAPS.

4.3.3. Određivanje Zn metodom ICP-MS

Za analizu na ICP-MS uređaju uzorke sjemenjnoj plazme razrijedili smo otopinom za diluciju u omjeru 1 : 20 (150 µl sjemenjnoj plazme i 2850 µl otopine za diluciju). Sastav otopine za diluciju je sljedeći: 0,01 EDTA (Sigma-Aldrich, Tokio, Japan), 0,004 % v/v NH₃ i 0,07 % v/v TritonX-100 (BDH Chemicals Ltd, Poole, Engleska) s dodatkom internih standarda Sc, Ge, Rh, Tb, Ir i Lu s koncentracijom od 1 µg/L (SCP Science, Quebec, Kanada).

Mjerenje koncentracije napravili smo na ICP-MS uređaju Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) koji je opremljen integriranim automatskim uzorkivačem, Octopole Reaction Systems (ORS) kolizijskom/reakcijskom ćelijom te MicroMist staklenim koncentričnim nebulizatorom i kvarcnom komorom za raspršivanje Scott tipa. Uloga kolizijske ćelije je smanjenje potencijalnih interferencija uzrokovanih

drugim ionima u uzorku. Za određivanje Zn koristili smo helij kao kolizijski plin s detekcijom karakterističnog iona za Zn ($m/z = 68$) u spektrometru masa. Svi plinovi koji su korišteni (argon, helij) su 99,999 % čistoće (Messer Hrvatska, Zaprešić, Hrvatska).

Za najbolju osjetljivost i najmanji potencijal interferencija, instrumentalne postavke i uvjeti su svakodnevno optimizirani automatskim postavkama upravljačkog softvera uređaja. Standardi Zn pripremljeni iz certificiranog referentnog materijala Zn (SCP Science, Quebec, Kanada) korišteni su za izradu kalibracijskih pravaca za određivanje Zn. Napravljeno je najmanje 5 kalibracijskih točaka razrjeđivanjem certificiranih standarda u očekivanom području koncentracija nepoznatih uzoraka (Zn 0 – 10 mmol/l). Za kontrolu kvalitete korišteni su komercijalni kontrolni uzorci ClinChek (Recipe, München, Njemačka) u dvije razine. Kontrole i kalibratori razrijedili su se otopinom za diluciju na isti način kao i uzorci. Procijenjena granica detekcije (LOD) za Zn je 0,003 mmol/l, a granica kvantifikacije (LOQ) za Zn je 0,011 mmol/l.



Slika 1. ICP-MS analizator za mjerenje metala u tragovima

Izvor: Agilent 7500 Series ICP-MS Hardware Manual, Rev A, 2008. (21)

4.4. Statističke metode

Statistička analiza provedena je programom MedCalc, verzija 12.4.0.0.0. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Deskriptivna statistika koristila se za prikaz podataka: kod normalne raspodjele (srednja vrijednost i standardna devijacija) i kod raspodjele koja nije normalna (medijan i interkvartilni raspon). Za obradu i prikaz podataka dobivenih dvjema analitičkim metodama koristili smo Passing-Bablokovu i Demingovu regresijsku analizu te Bland-Altmanov i Krouwer-Monti („Mountain“) grafički prikaz. $P < 0,05$ je predstavljao razinu značajnosti koja se koristila za ocjenu statističke značajnosti dobivenih rezultata.

5. REZULTATI

U ovom istraživanju izmjerena je koncentracija cinka u 185 uzoraka sjemene plazme koji su rutinski obrađeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek. Koncentracije cinka dobivene određivanjem spektrofotometrijskom metodom i ICP-MS metodom na istom skupu uzoraka testirani su Kolmogorov-Smirnovljevim testom koji je potvrdio da su rezultati dobiveni objema metodama normalno distribuirani.

Tablica 1. prikazuje sumarne statističke podatke i P vrijednosti Kolmogorov-Smirnovljeva testa za mjerenja Zn u sjemenjnoj plazmi spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom.

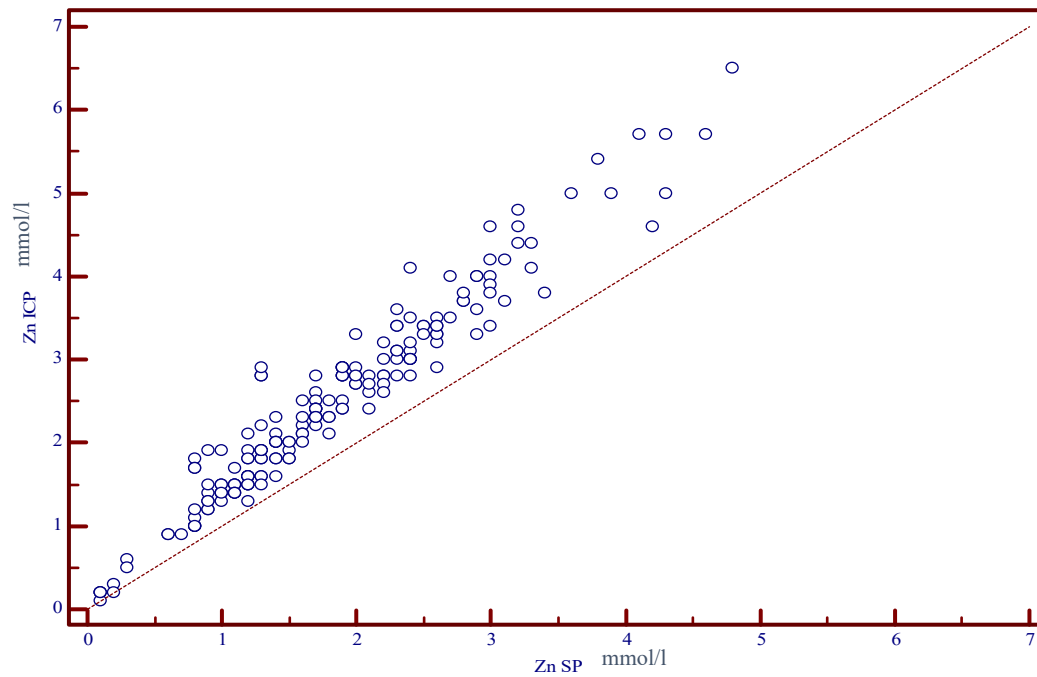
Tablica 1. Sumarni statistički podatci mjerenja Zn u sjemenjnoj plazmi dvjema metodama

	Spektrofotometrijska metoda	ICP MS metoda
Srednja vrijednost konc. Zn (mmol/l)	1,8465	2,5211
SD mjerenja (mmol/l)	0,9210	1,1810
Najniža vrijednost (mmol/l)	0,1000	0,1000
Najviša vrijednost (mmol/l)	4,8000	6,5000
P vrijednost*	0,1115	0,4020

* Kolmogorov-Smirnovljev test normalnosti distribucije; SD – standardna devijacija

REZULTATI

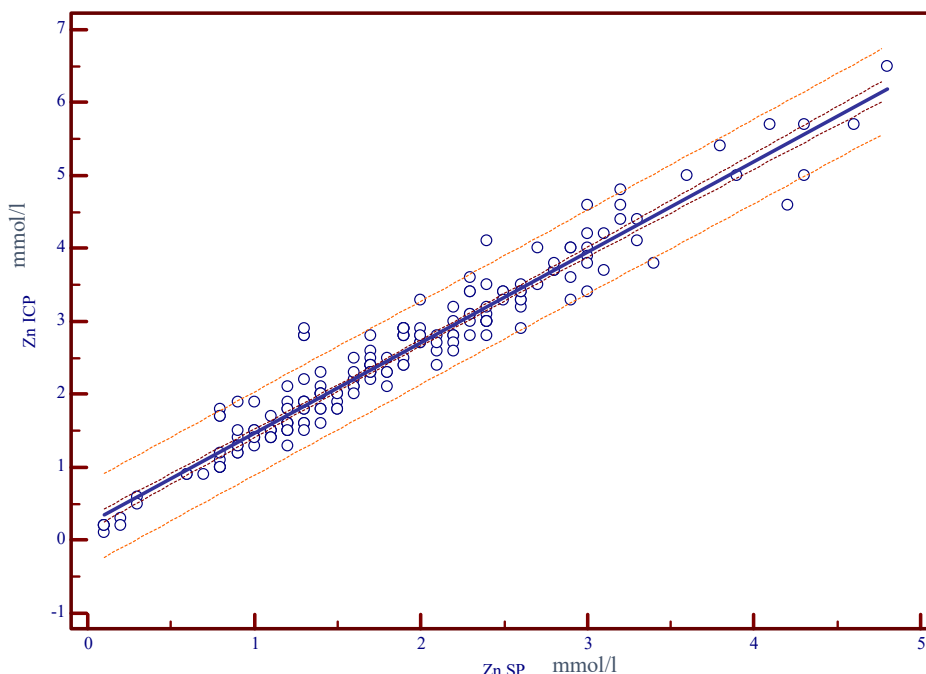
Slika 2. prikazuje raspršenje vrijednosti mjerenja Zn u sjemenjnoj plazmi dvjema metodama.



Slika 2. Grafički prikaz raspršenja vrijednosti

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom



Slika 3. Regresijski pravac linearne regresije

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

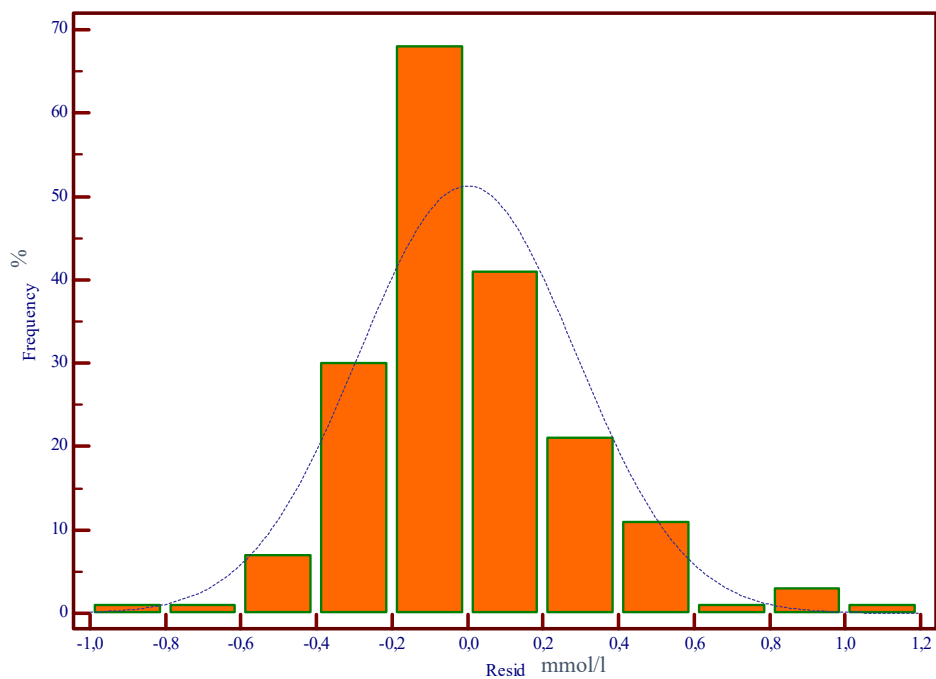
Na dobivenim podacima napravljena je linearna regresijska analiza. Dobiveni su sljedeći rezultati: jednačba pravca je $y = 0,2247 (95 \% \text{ CI } 0,1307 - 0,3187) + 1,2436 (95 \% \text{ CI } 1,1981 - 1,2892)$, $P < 0,001$. Koeficijent korelacije (r) je 0,9698, a koeficijent determinacije (r^2) je 0,9406.

Slika 3. prikazuje regresijski pravac linearne regresije s 95 % intervalom pouzdanosti regresijskog pravca (uža isprekidana linija) i 95 % intervalom predikcije (šira isprekidana linija).

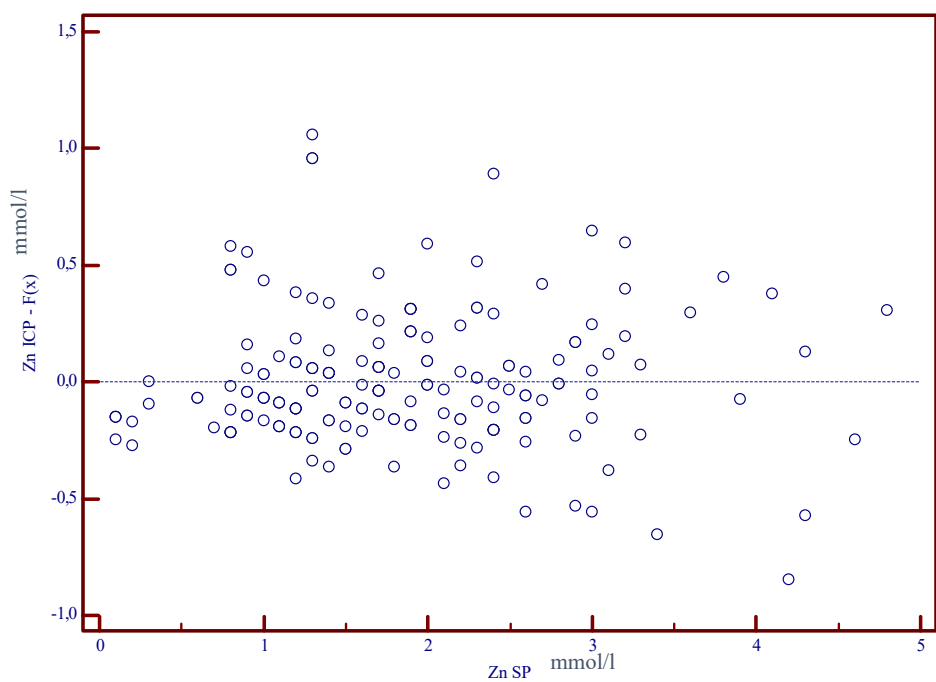
Slika 4. pokazuje distribuciju reziduala, odnosno frekvenciju odstupanja (u koracima od 0,2 mmol/l) vrijednosti Zn izmjerene ICP-MS metodom od vrijednosti predviđene jednačbom pravca.

Slika 5. pokazuje grafikon raspršenja reziduala, odnosno odstupanja vrijednosti Zn izmjerene ICP-MS metodom od vrijednosti predviđene jednačbom pravca.

REZULTATI



Slika 4. Distribucija reziduala linearne regresije



Slika 5. Grafikon raspršenja reziduala linearne regresije

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

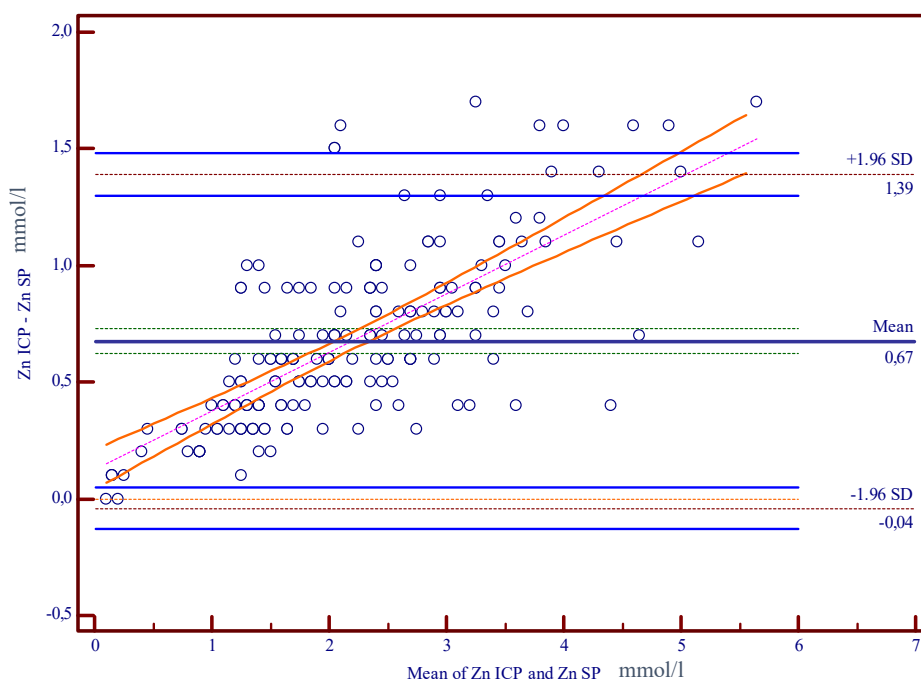
Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

F(x) – predviđene vrijednosti Zn ICP linearnom regresijom

REZULTATI

Slika 6. prikazuje Bland-Altmanov grafikon usporedbe apsolutnih razlika rezultata za određivanje Zn u sjemenjnoj plazmi u odnosu na srednju vrijednost mjerenja u različitim metodama za svaki uzorak. Točkasta linija predstavlja liniju nulte razlike; puna središnja linija predstavlja srednju vrijednost razlike mjerenja različitim metodama (s 95 % intervalom pouzdanosti odnosno točka-crta linijom ispod i iznad); gornja i donja isprekidana linija predstavljaju vrijednosti granica slaganja odnosno 1,96 SD razlika mjerenja (s 95 % intervalom pouzdanosti odnosno punim linijama ispod i iznad), a prikazan je i regresijski pravac razlika mjerenja različitih metoda u odnosu na srednju vrijednost mjerenja različitim metodama (linija točka-točka-crta), također s 95 % intervalom pouzdanosti (pune linije). Srednja vrijednost razlike između mjerenja različitim metodama prema Bland-Altmanovom grafu iznosi 0,6746 (95 % CI 0,6217 – 0,7275), s granicama slaganja -0,0408 (95 % CI -0,1314 – 0,0499) i 1,3900 (95 % CI 1,2993 – 1,4806).

Slika 7. prikazuje Bland-Altmanov grafikon usporedbe relativnih razlika rezultata (%) različitih metoda za određivanje Zn u sjemenjnoj plazmi u odnosu na srednju vrijednost mjerenja različitim metodama za svaki uzorak.

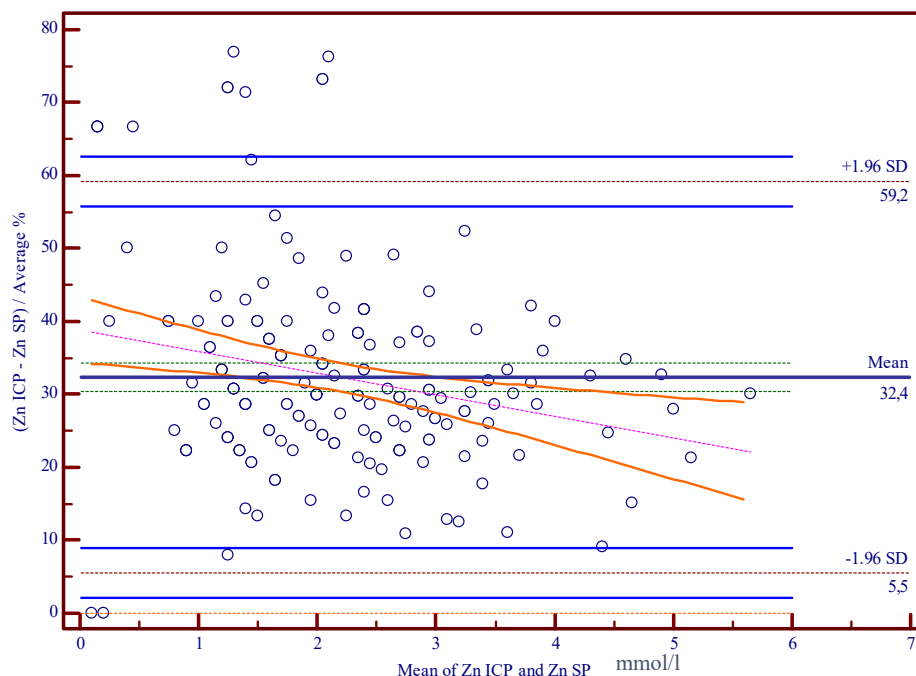


Slika 6. Bland-Altmanov grafikon usporedbe apsolutnih razlika rezultata

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

REZULTATI



Slika 7. Bland-Altmanov grafikon usporedbe relativnih razlika rezultata

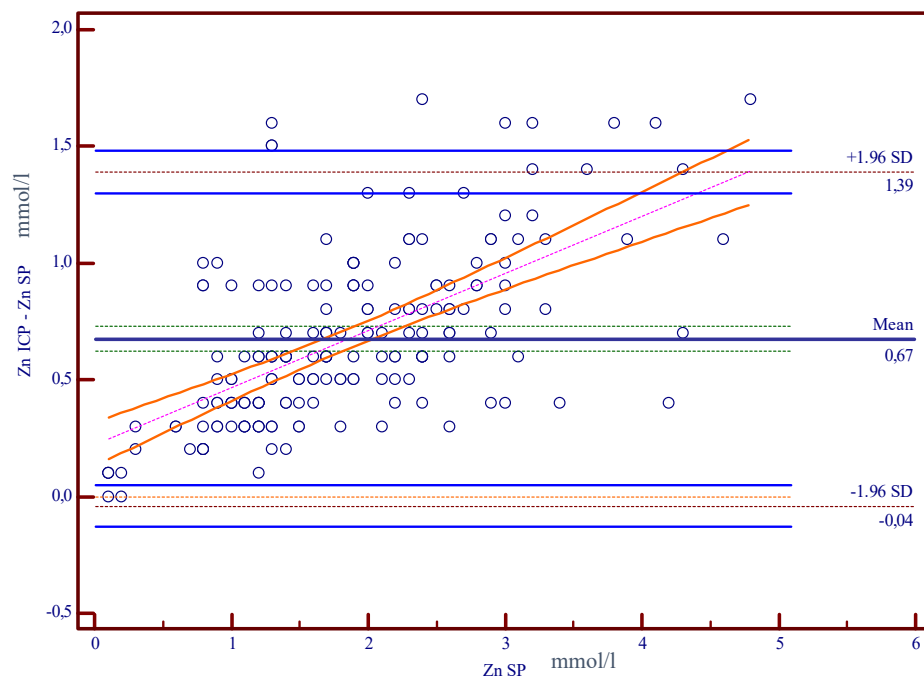
Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

Slika 8. prikazuje Krouwerov grafikon usporedbe apsolutnih razlika rezultata metoda za određivanje Zn u sjemenjnoj plazmi u odnosu na „referentnu“ metodu, odnosno metodu preporučenu od strane WHO-a.

Slika 9. prikazuje Krouwerov grafikon usporedbe relativnih razlika rezultata različitih metoda za određivanje Zn u sjemenjnoj plazmi u odnosu na „referentnu“ metodu, odnosno metodu preporučenu od strane WHO-a.

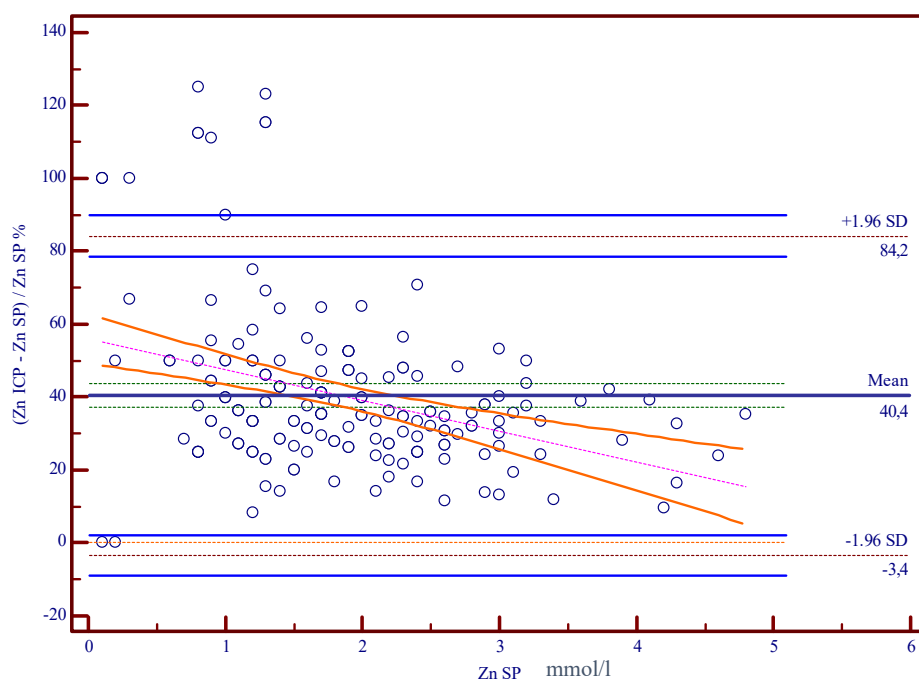
REZULTATI



Slika 8. Krouwerov grafikon usporedbe apsolutnih razlika rezultata

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom



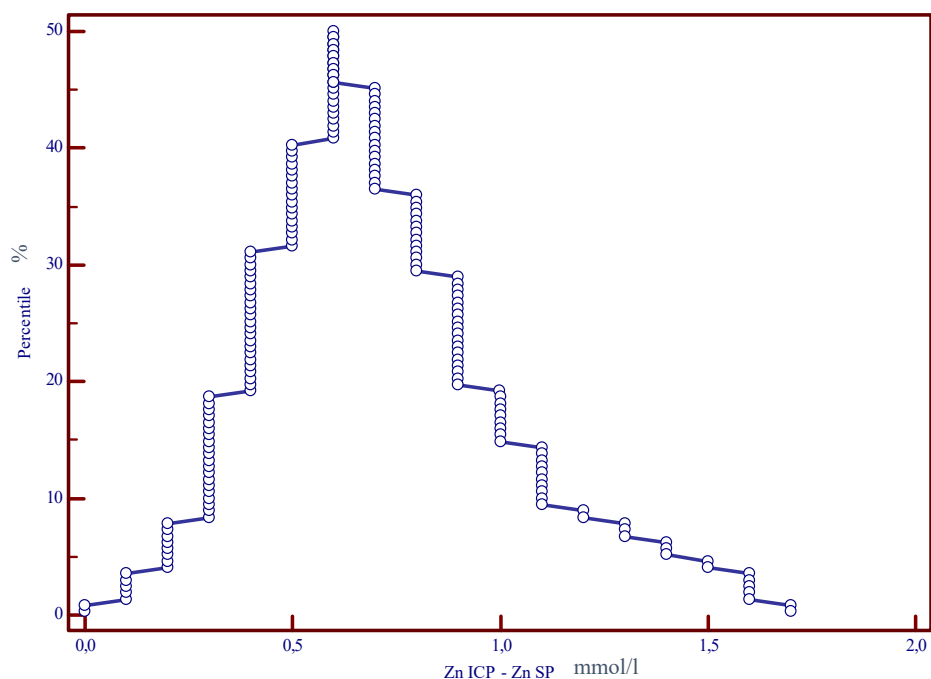
Slika 9. Krouwerov grafikon usporedbe relativnih razlika rezultata

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

REZULTATI

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

Slika 10. prikazuje Krouwer-Monti („Mountain“) grafikon usporedbe zastupljenosti apsolutnih razlika rezultata različitih metoda za određivanje Zn u sjemenjnoj plazmi. Medijan razlike mjerenja je 0,6; IQR je 0,4 – 0,9, dok je 90 % raspon razlika mjerenja 1,1 mmol/l.



Slika 10. Krouwer-Monti („Mountain“) grafikon

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

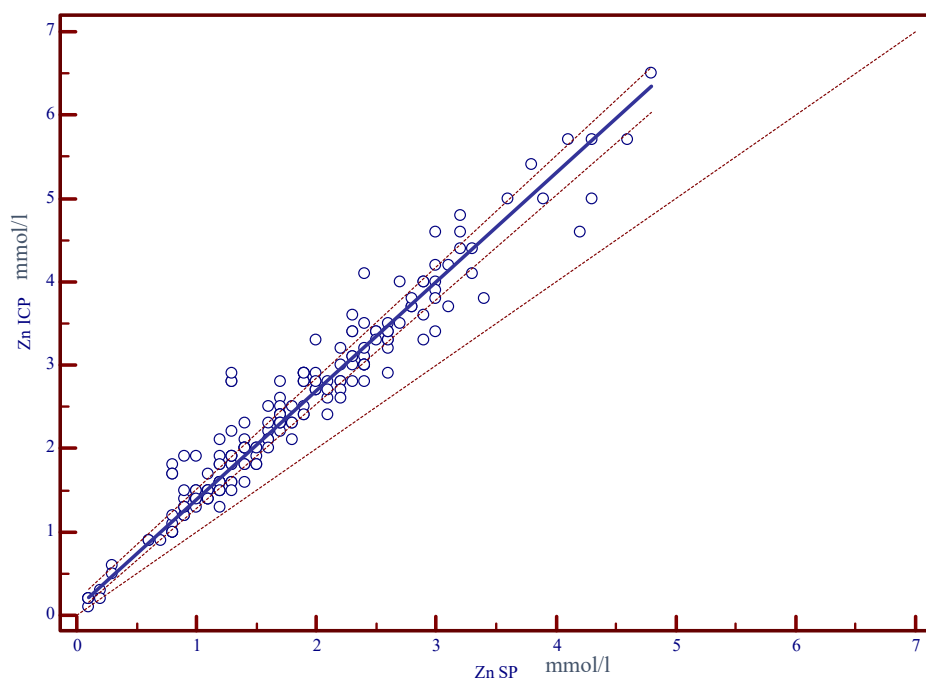
Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

Napravljena je i Passing-Bablokova regresijska analiza mjerenja Zn u sjemenjnoj tekućini različitim metodama. Dobiveni su sljedeći rezultati: jednadžba pravca je $y = 0,0848$ (95 % CI 0,0333 – 0,1750) + 1,3030 (95 % CI 1,2500 – 1,3333). Rezultat Cusum testa pokazuje da nema značajnog odstupanja od linearnosti ($P = 0,23$).

Slika 11. prikazuje Passing-Bablok regresijski pravac s 95 % intervalom pouzdanosti regresijskog pravca (isprekidana linija).

Slika 12. pokazuje raspršenje Passing-Bablok reziduala.

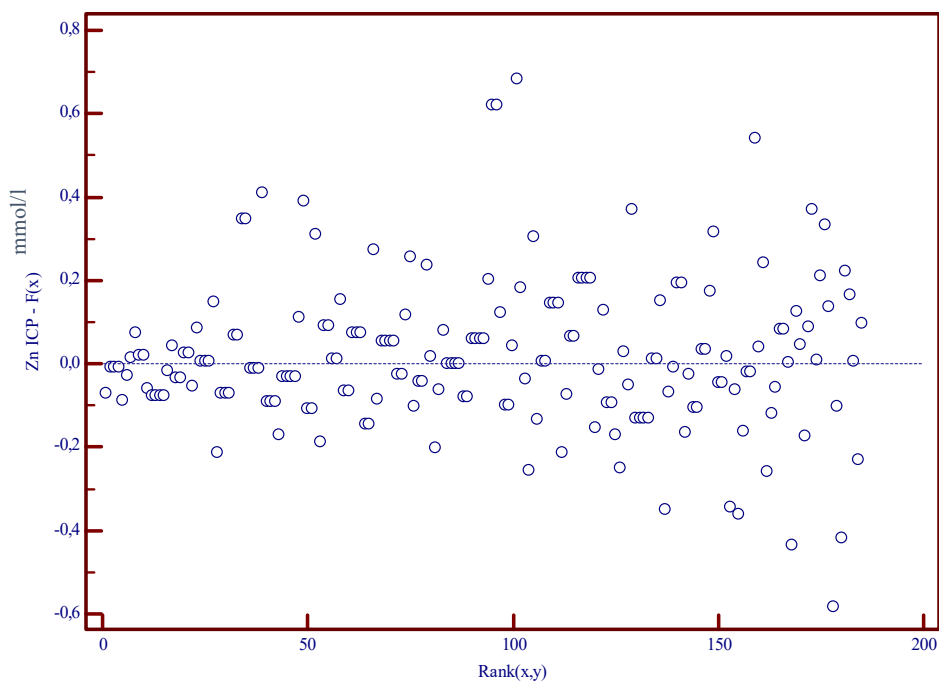
REZULTATI



Slika 11. Passing-Bablok regresijski pravac

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom



Slika 12. Raspršenje Passing-Bablok reziduala

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

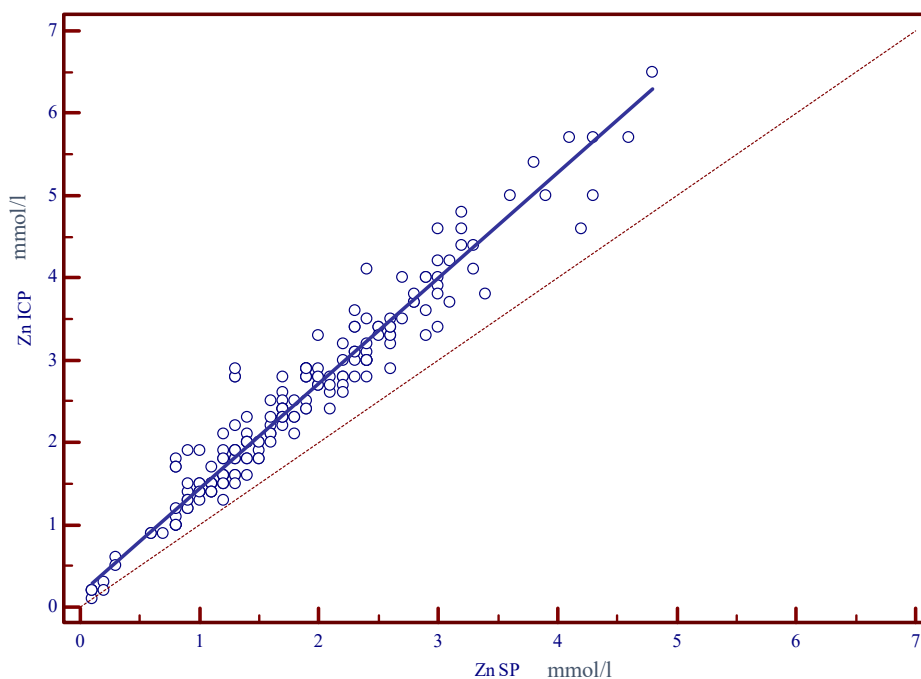
REZULTATI

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

F(x) – predviđene vrijednosti Zn ICP linearnom regresijom

Napravljena je i Demingova regresijska analiza mjerenja Zn u sjemenoj tekućini različitim metodama. Dobiveni su sljedeći rezultati: jednačba pravca je $y = 0,1579$ (95 % CI 0,0678 – 0,2481) + $1,2798$ (95 % CI 1,2273 – 1,3323).

Slika 13. prikazuje Demingov regresijski pravac sa zadanim koeficijentom varijacije mjerenja za obje metode od 10 %.



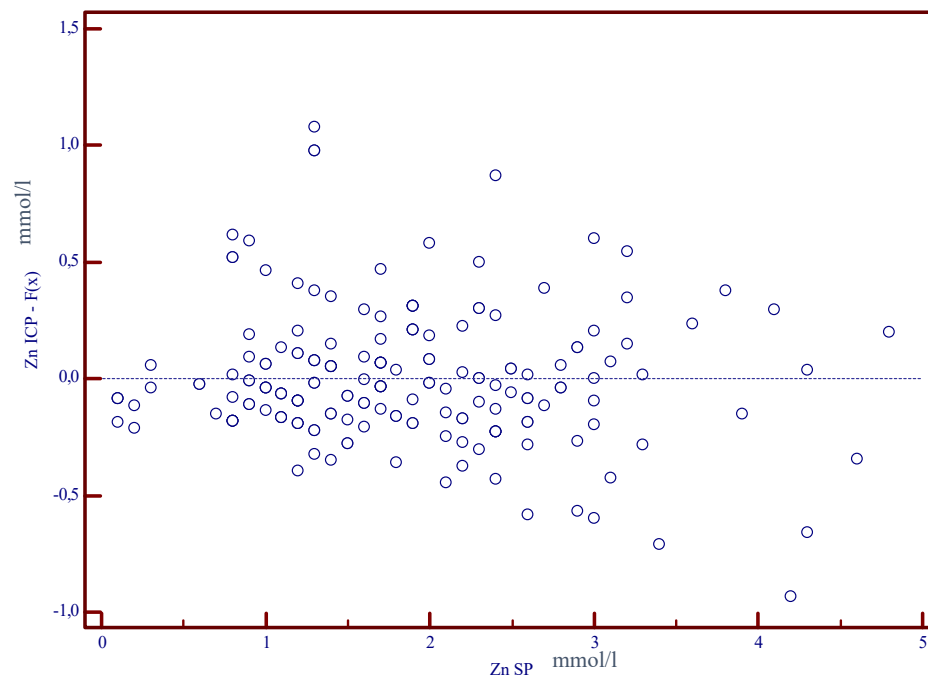
Slika 13. Demingov regresijski pravac

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

REZULTATI

Slika 14. pokazuje raspršenje Demingovih reziduala.



Slika 14. Demingovi reziduali

Zn ICP – rezultati koncentracije Zn dobiveni ICP-MS metodom

Zn SP – rezultati koncentracije Zn dobiveni spektrofotometrijskom metodom

F(x) – predviđene vrijednosti Zn ICP linearnom regresijom

6. RASPRAVA

Prvi korak pri ispitivanju usporedivosti metoda je vizualni pregled podataka. Vizualni pregled uključuje provjeru postoje li ekstremne vrijednosti (engl. *outliers*), daje uvid u prirodu odnosa dviju metoda te vizualizira raspon vrijednosti obuhvaćenih usporedbom. Prilikom usporedbe rezultata mjerenja dviju metoda koristili smo se dvodimenzionalnom vizualizacijom podataka – grafikonom raspršenja. U grafikonu raspršenja vrijednosti (Slika 2.) prikazali smo odnos dvije varijable, jedna iscrtana duž osi x (mjerenja dobivena spektrofotometrijskom metodom), a druga iscrtana duž osi y (mjerenja dobivena ICP-MS metodom) s linijom jednakosti koja prolazi sredinom grafikona i prikazuje idealno slaganje podataka na osi x i osi y. Ovim grafičkim prikazom možemo vizualno procijeniti slaganje mjerenja različitim metodama budući da svaka točka predstavlja kombinaciju rezultata mjerenja različitim metodama za isti uzorak. Iz našeg grafičkog prikaza primjećujemo da se obje varijable kreću u istom smjeru, stoga možemo zaključiti da je korelacija pozitivna. S obzirom na raspršenje točaka i njihov odnos naspram linije jednakosti, uočavamo kako su točke kod nižih vrijednosti grupirane bliže liniji jednakosti, a kod viših vrijednosti dalje od linije jednakosti, što nam govori da postoji razlika među mjerenjima različitim metodama koja je izraženija kod većih koncentracija cinka. Ovim grafičkim prikazom možemo samo vizualno procijeniti mjeru slaganja podataka, a stvarnu mjeru slaganja ili korelacije mjerenja različitim metodama možemo odrediti ako podatke obradimo metodom linearne regresijske analize gdje smo za nezavisnu varijablu odabrali mjerenja uobičajenom spektrofotometrijskom metodom, a za zavisnu varijablu mjerenja ICP-MS metodom. Jačinu korelacije vizualno procjenjujemo pomoću raspršenja točaka na grafikonu raspršenja vrijednosti na kojemu smo prikazali regresijski pravac s 95-postotnim intervalom pouzdanosti i 95-postotnim intervalom predikcije (Slika 3.). Što su točke bliže regresijskom pravcu, to je korelacija veća. Ako su točke raspršenije, tada je korelacija manja. Koeficijent korelacije dobiven linearnom regresijskom analizom $r = 0,9698$ ($P < 0,001$) ukazuje na statistički značajnu jaku korelaciju podataka mjerenja koncentracije cinka u sjemenoj plazmi dobivenih spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom. Reziduali predstavljaju razlike pojedinačnih mjerenja zavisne varijable (mjerenja ICP-MS metodom) od vrijednosti dobivene iz jednadžbe pravca linearne regresije. Vizualnom analizom grafikona distribucije (Slika 4.) možemo uočiti kako ona slijedi približno normalnu razdiobu. Isto tako, vizualnom analizom grafikona raspršenja reziduala (Slika 5.) možemo uočiti kako su reziduali raspršeni nasumično, bez nekog uočljivog trenda. I jedno i drugo nam govori kako je jednadžba pravca linearne regresije jednako dobra za cijeli raspon uspoređenih vrijednosti mjerenja dobivenih spektrofotometrijskom i ICP-MS

metodom. Linearna regresijska analiza nam govori da postoji značajna linearna povezanost između dvije uspoređene metode, ali nam ne ukazuje koliko je stvarno slaganje rezultata i ne može ukazati na postojanje konstantne ili proporcionalne razlike u mjerenjima različitim metodama.

Usporedbom sumarnih statističkih podataka koncentracije cinka u sjemenoj plazmi dobivenih spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom (Tablica 1.), može se primijetiti kako postoji razlika između srednjih vrijednosti mjerenja različitim metodama (0,6746 mmol/l). Ipak, kako bismo utvrdili postoji li statistički značajna razlika u mjerenjima koncentracije cinka spektrofotometrijskom metodom i metodom ICP-MS, potrebno je dobivene podatke obraditi specifičnim statističkim testovima za usporedbu analitičkih metoda.

Grafikon razlike između dobivenih mjerenja (engl. *difference plot*), odnosno Bland-Altmanov grafikon može nam pomoći da uočimo postoji li i kolika je razlika u mjerenjima dvjema metodama u različitim koncentracijskim područjima, odnosno postoji li konstantna i/ili proporcionalna razlika u mjerenjima različitim metodama. Uobičajeni način prikazivanja Bland-Altmanova grafikona je da je na osi y prikazana razlika mjerenja dvjema metodama, a na osi x je prikazana srednja vrijednost dvaju mjerenja. Rezultati su na Bland-Altmanovom grafikonu prikazani s granicama slaganja ($\pm 1,96$ SD) i srednjom vrijednošću odstupanja između dva mjerenja te regresijskim pravcem razlika (svaki parametar sa svojim 95-postotnim intervalom pouzdanosti). Usporedba podataka dobivenih mjerenjem koncentracije cinka spektrofotometrijskom i ICP-MS metodom Bland-Altmanovim grafikonima prikazani su na Slici 6. za apsolutne razlike mjerenja i na Slici 7. za relativne razlike mjerenja. Jedan od uvjeta za analizu podataka Bland-Altmanovim grafikonom je da je 95 % točaka u grafikonu unutar 2 SD, što je u našem slučaju točno budući da je samo osam točaka (od 185) izvan 2 SD. Analiza grafikona na Slici 6. pokazuje kako postoji razlika u mjerenjima od 0,6746 mmol/l, odnosno da metoda ICP-MS daje u prosjeku toliko viša mjerenja od spektrofotometrijske metode za određivanje cinka u sjemenoj plazmi. Važno je procijeniti je li ta razlika konstantna u cijelom rasponu izmjerenih koncentracija ili se mijenja ovisno o izmjerenoj koncentraciji cinka, a to možemo uočiti analizom raspršenja točaka u Bland-Altmanovu grafikonu, odnosno promatranjem smjera regresijskog pravca (Slika 6.). Iz Slike 6. je vidljivo da regresijski pravac razlika mjerenja ima značajan pozitivan nagib ovisno o srednjoj vrijednosti mjerenja i da je kod većih vrijednosti koncentracija cinka i veća apsolutna razlika, odnosno možemo zaključiti kako postoji proporcionalna razlika u mjerenju različitim metodama. Slično možemo zaključiti i analizom Slike 7. gdje je također vidljivo da postoji i

proporcionalna razlika u relativnim razlikama rezultata, ali ovaj puta u suprotnom pravcu (nagib regresijskog pravca je negativan), odnosno relativna razlika između mjerenja različitim metodama je manja kod većih koncentracija cinka u sjemenoj tekućini.

Varijacija Bland-Altmanovog grafikona je Krouwerov grafikon kod kojega se uspoređuje razlika mjerenja dvjema metodama (os y) u odnosu na mjerenja dobivena tzv. „referentnom“ metodom. Budući da se spektrofotometrijska metoda određivanja cinka u sjemenoj plazmi najčešće rutinski koristi u kliničkim laboratorijima i da je preporučena od strane WHO, nju smo izabrali za „referentnu“ metodu. Slike 8. i 9. prikazuju Krouwerove grafikone usporedbe apsolutnih i relativnih razlika mjerenja različitim metodama gdje je isto tako vidljivo kako postoji pozitivna proporcionalna razlika u apsolutnim vrijednostima razlika mjerenja i negativna proporcionalna razlika u relativnim razlikama mjerenja.

Bland-Altmanova usporedba metoda određivanja cinka u sjemenoj plazmi dala nam je sljedeće informacije: postoji statistički značajna razlika u mjerenju ovim metodama koja se proporcionalno povećava s koncentracijom cinka u uzorku (Slika 6. i 8.), dok se varijabilnost razlike mjerenja smanjuje povećanjem koncentracije cinka u uzorku (Slika 7. i 9.).

Još jedan način prikaza razlike među mjerenjima dvjema metodama je Krouwer-Monti (tzv. „Mountain“) grafikon koji nam daje informaciju o distribuciji razlika među mjerenjima (Slika 10.). Kod njega je lakše procijeniti središnju vrijednost (medijan) kao i rasap razlika mjerenja (IQR i 90-postotni percentil). Vrijednosti medijana (0,6 mmol/l) i rasapa razlika (IQR 0,4 – 0,9; 90 % percentil 1,1 mmol/l) slične su onima dobivenima Bland-Altmanovom analizom.

Passing-Bablokova regresijska analiza je možda i najpogodnija za usporedbu analitičkih metoda u kliničkom laboratoriju budući da je neparametrijska (nije ovisna o vrsti distribucije podataka), obje metode smatra jednakovrijednim i nije osjetljiva na prisutnost ekstremnih vrijednosti. Preduvjeti za primjenu Passing-Bablokove regresijske analize je kontinuirana distribucija mjerenja (širok raspon koncentracija), linearni odnos između mjerenja i dovoljna količina mjerenja (najmanje 40). U jednadžbi regresijskog pravca vrijednost odsjeka na osi y (s 95-postotnim intervalom pouzdanosti) pokazuje konstantno, a vrijednost nagiba pravca (također s 95-postotnim intervalom pouzdanosti) proporcionalno odstupanje u mjerenjima. Još jedna prednost Passing-Bablokove regresijske analize je mogućnost izračuna reziduala okomito na regresijski pravac, što daje točnije rezultate u odnosu na klasični model izračuna odstupanja okomito na pravac paralelno s osi y kod

linearne regresije. Rezultati Passing-Bablokove regresijske analize (Slika 11.) ukazuju na vrlo malenu, ali statistički značajnu konstantnu razliku između mjerenja koncentracije cinka dvjema metodama (odsječak na osi y je 0,0848 dok 95-postotni interval pouzdanosti ne uključuje nulu). Osim konstantne, vidljiva je i statistički značajna proporcionalna razlika između mjerenja (koeficijent regresijskog pravca je 1,303, a 95-postotni interval pouzdanosti ne uključuje vrijednost jedan). Grafikon raspršenja reziduala (Slika 12.), kao i rezultati Cusum testa ($P = 0,23$) pokazuju da nema značajnog odstupanja od linearnosti.

Osim Passing-Bablokove regresijske analize za usporedbu naših metoda koristili smo i Demingovu regresijsku analizu. Za razliku od obične linearne regresije i Passing-Bablokove regresijske analize, Demingova regresijska analiza uzima u obzir nepreciznost obje mjerne metode. Koeficijent varijacije koji smo koristili za obje metode je 10 %. Rezultati dobiveni Demingovom regresijom vrlo su slični onima dobivenim Passing-Bablokovom regresijskom analizom: isto tako je vidljiva statistički značajna konstantna razlika (odsječak na osi y je 0,1579 dok 95-postotni interval pouzdanosti ne uključuje nulu) i statistički značajna proporcionalna razlika između mjerenja (koeficijent regresijskog pravca je 1,2798, a 95-postotni interval pouzdanosti ne uključuje vrijednost jedan).

Rezultati usporedbe spektrofotometrijske i ICP-MS metode za određivanje cinka u sjemenoj tekućini pokazuju kako metode nisu usporedive: postoji mala, ali statistički značajna konstantna razlika (otprilike 0,08 mmol/l prema Passing-Bablokovojoj regresiji i otprilike 0,16 mmol/l prema Demingovoj regresiji) te značajna proporcionalna razlika (otprilike 30,30 % prema Passing-Bablokovojoj regresiji i otprilike 27,98 % prema Demingovoj regresiji) u koncentracijama cinka u sjemenoj plazmi, odnosno metoda ICP-MS daje otprilike 30 % više vrijednosti cinka od spektrofotometrijske metode. Mogući uzrok takve razlike u mjerenjima je u tome da kod spektrofotometrijske metode nema deproteinizacije te da kod nje reakciju daje samo slobodna frakcija cinka u sjemenoj plazmi, dok ona vezana za proteine reagira u daleko manjoj mjeri. Kod ICP-MS metode mjeri se kompletna frakcija cinka, uključujući i onaj vezan za proteine koji se dezintegriraju u plazmi čime se oslobađa vezani cink.

Nije pronađena niti jedna objavljena publikacija koja uspoređuje ove dvije metode, no u nekim je istraživanjima na sličan način opisana usporedba mjerenja GF AAS (engl. *graphite furnace atomic absorption spectroscopy*) i FAAS (engl. *flame atomic absorption spectroscopy*) metodom ICP-MS (22,23). Rezultati su statistički obrađeni Spearmanovim koeficijentom korelacije i Wilcoxonovim testom za određivanje razlike u medijanima te

linearnom regresijom i t-testom. S obzirom na neadekvatan način usporedbe metoda, ova istraživanja ne pružaju pravu sliku o usporedivosti metoda za razliku od našeg istraživanja koje je koristilo statističke metode za usporedbu metoda u kliničkom laboratoriju.

7. ZAKLJUČAK

Mjerenjem koncentracije cinka u sjemenoj plazmi na ICP-MS analizatoru, ispitali smo postoji li usporedivost rezultata ICP-MS metodom i metodom preporučenom od strane WHO-a. Detaljnom statističkom obradom i interpretacijom rezultata zaključili smo sljedeće:

- 1) Vizualnim pregledom i metodom linearne regresije zaključili smo kako postoji visoka korelacija ($r = 0,9698$), ali i razlika između mjerenja (razlika između srednjih vrijednosti mjerenja $0,6746 \text{ mmol/l}$).
- 2) Bland-Altmanovom analizom utvrdili smo kako postoji konstantna, ali isto tako i proporcionalna razlika u mjerenjima.
- 3) Passing-Bablokovom i Demingovom regresijom uočena je mala, ali statistički značajna konstantna razlika (otprilike $0,08 \text{ mmol/l}$ prema Passing-Bablokovoj regresiji i otprilike $0,16 \text{ mmol/l}$ prema Demingovoj regresiji) te značajna proporcionalna razlika (otprilike $30,30 \%$ prema Passing-Bablokovoj regresiji i otprilike $27,98 \%$ prema Demingovoj regresiji).
- 4) Rezultati usporedbe spektrofotometrijske i ICP-MS metode za određivanje cinka u sjemenoj tekućini pokazuju kako metode nisu usporedive.

Brzina, cijena, pristupačnost i jednostavnost analize smatraju se jednim od najvećih prednosti spektrofotometrijskih metoda. Suprotno njima, ICP-MS metoda zahtijeva vremenski dužu obradu uzoraka i veliko znanje analitičara za korištenje određenih dijelova analizatora i interpretaciju rezultata. Također velika mana ove metode je nepristupačnost, visoka cijena analizatora i visoki troškovi rada i održavanja. Iako ICP-MS metoda daje neusporedivo točnije rezultate, zbog složenosti, cijene i nedostupnosti trenutno nije prikladna za rutinsku kliničku primjenu.

8. SAŽETAK

Uvod: za kliničku obradu pacijenata s poremećajima plodnosti važna je brza obrada i analiza uzorka te točni rezultati. Metoda induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS) pogodna je za mjerenje brojnih metala i metaloida u biološkim uzorcima pri vrlo niskom limitu detekcije. Spektrofotometrijske metode preporučene su za mjerenje cinka zbog brzine analize, pristupačnosti i jednostavnosti.

Cilj: cilj ovog istraživanja je usporediti rezultate koncentracije cinka u sjemenjnoj tekućini dobivene metodom preporučenom od strane WHO-a (spektrofotometrijska metoda s 5-Br-PAPS) s rezultatima dobivenim ICP-MS metodom.

Materijali i metode: za ovo istraživanje korišteni su uzorci sjemenjne plazme 185 ispitanika koji su zaprimljeni u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek zbog ispitivanja neplodnosti tijekom perioda od godine dana. Nakon odgovarajuće obrade uzorka, određivanje koncentracije cinka u sjemenjnoj plazmi radilo se na ICP-MS analizatoru Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Tokio, Japan) i spektrofotometrijskom metodom (Sentinel Diagnostics, Milano, Italija) na biokemijskom analizatoru Beckman-Coulter AU680 (Beckman-Coulter, Brea, SAD).

Rezultati: rezultati usporedbe spektrofotometrijske i ICP-MS metode za određivanje cinka u sjemenjnoj tekućini pokazuju kako postoji mala, ali statistički značajna konstantna razlika (otprilike 0,08 mmol/l prema Passing-Bablokovojoj regresiji i otprilike 0,16 mmol/l prema Demingovoj regresiji) te znatna proporcionalna razlika (otprilike 30,30 % prema Passing-Bablokovojoj regresiji i otprilike 27,98 % prema Demingovoj regresiji) u rezultatima.

Zaključak: rezultati usporedbe spektrofotometrijske i ICP-MS metode za određivanje cinka u sjemenjnoj tekućini pokazuju kako metode nisu usporedive. Iako ICP-MS metoda daje neusporedivo točnije rezultate, zbog složenosti, cijene i nedostupnosti trenutno nije prikladna za rutinsku kliničku primjenu.

Ključne riječi: cink; ICP-MS; sjemenjna plazma; spektrofotometrijska metoda

9. SUMMARY

Comparison of spectrophotometric method with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for determination of zinc in seminal plasma

Introduction: Rapid processing, sample analysis and accurate results are crucial for clinical data management of patients with fertility problems. The method of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is suitable for measurement of a large number of metals and metalloids in biological samples upon a very low detection limit. Spectrophotometric methods are recommended for measurement of zinc levels due to the speed of analysis, accessibility and simplicity.

Objective: The objective of this research is to compare the results of zinc concentrations in seminal fluid obtained using the method recommended by the WHO (spectrophotometric method with 5-Br-PAPS) with the results obtained through the ICP-MS method.

Materials and methods: This research used seminal plasma samples provided by 185 respondents who were admitted to the Department for Clinical Laboratory Diagnostics of the Clinical Hospital Centre in Osijek for infertility testing over a one-year period. After adequate sample processing, zinc concentrations in seminal fluid were determined on ICP-MS analyser Agilent 7500cx (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) and through spectrophotometric method (Sentinel Diagnostics, Milan, Italy) on biochemical analyser Beckman-Coulter AU680 (Beckman-Coulter, Brea, USA).

Results: The results of the comparison between spectrophotometric and ICP-MS method for determination of zinc levels in seminal fluid showed that there is a small, yet statistically significant constant difference (around 0.08 mmol/l according to Passing-Bablok regression and around 0.16 mmol/l according to Deming regression) and a significant proportional difference (around 30.30% according to Passing-Bablok regression and around 27.98% mmol/l according to Deming regression) in the results.

Conclusion: The results of the comparison between spectrophotometric and ICP-MS methods for determination of zinc levels in seminal fluid showed that the two methods are not comparable. Irrespective of the fact that ICP-MS method gives incomparably more accurate

SUMMARY

results, due to its complexity, price and unavailability, it is currently unsuitable for routine clinical use.

Keywords: zinc; ICP-MS; seminal plasma; spectrophotometric method

10. LITERATURA

1. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Resulting from the Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories. Vol. 74, Pure Appl. Chem. 2002
2. Saračević A. Method validation and verification. Zagreb: Medicinska naklada; 2013 Jan 1
3. Coulter B, Development P. AU680 Chemistry Analyzer In-Lab Training Manual. (September) 2016; 1–152
4. Silva MFC. Application of ICP-MS in the optimisation of a new methodology for ⁶⁸Ga production in a PET dedicated cyclotron. (September) 2016
5. Prasad AS. Discovery of Human Zinc Deficiency: Its Impact on Human Health and Disease. Adv Nutr. 2013;4(2):176
6. Kerns K, Zigo M, Sutovsky P. Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. Int J Mol Sci. Dec 2018;19(12):4097
7. Tessema M, De Groote H, D. Brouwer I, J.M. Feskens E, Belachew T, Zerfu D, et al. Soil Zinc Is Associated with Serum Zinc But Not with Linear Growth of Children in Ethiopia. Nutrients. 2019 Jan 22;11(2):221
8. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Physiol Rev. 1993 Jan;73(1):79–118
9. Imdad A, Bhutta ZA. Effect of preventive zinc supplementation on linear growth in children under 5 years of age in developing countries: a meta-analysis of studies for input to the lives saved tool. BMC Public Health. 2011 Apr 13;11 Suppl 3(Suppl 3):S22
10. Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. J Reprod Infertil. 2018;19(2):69–81
11. Roy B, Baghel RPS, Mohanty TK, Mondal G. Zinc and Male Reproduction in Domestic Animals : A Review. Indian J Anim Nutr. 2013;4(30):339–50

12. Zhao J, Dong X, Hu X, Long Z, Wang L, Liu Q, et al. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 Mar 2;6:22386
13. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res*. 2009 Feb ;29(2):82–8
14. Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta T, Tozawa Y, Iwai T, et al. Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One*. 2011 Feb 18 ;6(2):e16938
15. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008 May 1;14(3):243–58
16. Atig F, Raffa M, Habib B-A, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urol*. 2012 Dec 19;12(1):6
17. Hrvatska Veterinarska Komora. J, Lovrić Z, Vranković L, Ljubić BB, Crnić AP, Lojkić M, et al. Hrvatski veterinarski vjesnik = Kroatischer veterinärmedizinischer Anzeiger = Croatian veterinary report. Vol. 25, Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora. 1996. 64-73 p
18. Falsig A -M. L, Gleerup CS, Knudsen UB. The influence of omega-3 fatty acids on semen quality markers: a systematic PRISMA review. *Andrology*. 2019 May 22;andr.12649
19. Šimunić V, Ciglar S, Suchanek E. *Ginekologija*. Naklada Ljevak; 2001
20. Jarow J, Sigman M, Kolettis PN, Lipshultz LR, Mcclure RD, Nangia AK, et al. The Optimal Evaluation of the Infertile Male : AUA Best Practice Statement. *Am Urol Assoc Educ Res Inc*. 2010;1–38
21. Agilent Technologies Inc. Agilent 7500 Series ICP-MS Hardware Manual, Rev A, 2008
22. Aguiar GFM, Batista BL, Rodrigues JL, Luccas PO, Barbosa Jr. F. Evaluation of inductively coupled plasma mass spectrometry for determining Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Se and Zn in bovine semen samples using a simple sample dilution method. *J Braz Chem*

LITERATURA

Soc. 2012 Mar;23(3):573–80

23. Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjöllund NHI, Bonde JPE, Stoltenberg M, Ernst E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Mol Hum Reprod.* 1999 Apr 1;5(4):331–7

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Viktorija Cigler

Datum i mjesto rođenja: 5. 5. 1994., Zagreb

Adresa stanovanja: Lojenov prilaz 8, 10 020 Zagreb

Broj mobitela: 098/9932-528

e-mail: viktorijacigler@gmail.com

OBRAZOVANJE

2009. – 2013. – Jezična gimnazija (XVI.); Zagreb

2013. – 2016. – Zdravstveno veleučilište u Zagrebu; preddiplomski stručni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

2016. – 2019. – Medicinski fakultet u Osijeku; diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

RADNO ISKUSTVO

2011. i 2012. – sezonski rad u Lush trgovini

2013. – rad u trgovini Mondays

2013. – 2016. – rad u trgovini Harissa

2015. i 2016. – sezonski rad u laboratoriju Zagrebačkih otpadnih voda

2018. – sezonski rad u Lush manufakturi

VJEŠTINE

- aktivno služenje jezicima: engleski i talijanski
- rad na računalu (Word, Excel, PowerPoint)
- vozačka dozvola (B-kategorija)